

眼蚤属 (*Ophthalmopsylla*) 两蚤种的 rDNA ITS2 序列研究

王 赞¹, 漆一鸣^{2*}

(1. 贵阳医学院 医学生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究伏河眼蚤异常亚种 *Ophthalmopsylla volgensis extrema* (Ioff et Scalon, 1953) 和长突眼蚤 *Ophthalmopsylla kiritschenkoi* (Wagner, 1930) rDNA ITS2 序列, 为蚤类分子系统发育的研究提供基础资料。方法: PCR 扩增两蚤种 rDNA ITS2 片段并测序, 比较两者差异。结果: 伏河眼蚤异常亚种 rDNA ITS2 序列长 372 bp, 长突眼蚤长 380 bp; 两蚤种间共有 30 处碱基不同, 包括 16 处缺失/插入、4 处转换、10 处颠换, 种内无差异。结论: rDNA ITS2 序列可用作两蚤种鉴别的分子标记。

[关键词] 蚤; 序列分析; 第二内转录间隔区 (ITS2)

[中图分类号] R384.3; Q523+.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)02-0151-03

Analysis of rDNA ITS2 Sequences of Two Species in Genus *Ophthalmopsylla*

WANG yun¹, QI Yiming²

(1. Department of Medical Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Biology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the sequences of rDNA ITS2 of *Ophthalmopsylla volgensis extrema* Ioff et Scalon, 1953 (*O. v. extrema*) and *Ophthalmopsylla kiritschenkoi* Wagner, 1930 (*O. kiritschenkoi*) for the first time, and so as to provide basic information for the research of siphonaptera phylogenesis. **Methods:** rDNA ITS2 of the two species was amplified by PCR and sequenced, and the differences between them were analyzed. **Results:** The length of rDNA ITS2 of *O. v. extrema* is 372 bp, while that of *O. kiritschenkoi* is 380 bp. There are thirty differences basically between the two species, including 16 deletions/insertions, 4 transitions and 10 transversions. There was no intraspecific difference. **Conclusion:** The rDNA ITS2 could be used as a molecular marker for distinction of the two species.

[Key words] fleas; sequence analysis; internal transcribed spacer 2 (ITS2)

伏河眼蚤 *Ophthalmopsylla volgensis* (Wagner et Ioff, 1926) 和长突眼蚤 *Ophthalmopsylla kiritschenkoi* (Wagner, 1930) 隶属于细蚤科 Leptopsyllidae Baker, 1905 双蚤亚科 Amphipsyllinae Ioff, 1936 眼蚤属 *Ophthalmopsylla* Wagner et Ioff, 1926。我国内蒙古地方病防治研究所曾从长突眼蚤体内分离出自然感染鼠疫菌^[1], 因此其具有较高的医学重要性。ITS (internal transcribed spacer) 即 rDNA 内转录间隔区, 在昆虫系统发育的研究中作为一种良好的分

子标记得到了广泛的运用^[2], 但 rDNA ITS 在蚤类系统发育的研究中相对较少, 迄今国内外相关研究仅见栉眼蚤科、角叶蚤科和蚤科部分蚤种的 rDNA ITS 序列报道^[3~7], 这些数据尚不足以全面构建 rDNA ITS 序列的蚤类分子系统树, 因而补充更多蚤种的 rDNA ITS 序列显得尤为重要。目前对眼蚤属的分子系统学方面的研究报道极少见, 国外, 仅见 Whiting M. F. 等 (2008) 对眼蚤属角尖眼蚤指名亚种 *O. praefecta praefecta* 和前凹眼蚤 *O. jett-*

* 通讯作者 E-mail: qiyiming6259@sina.com

mari rDNA 的 18S、28S 序列及 EF-1 α 序列进行了分析比较^[8],国内尚未见报道。本文首次对伏河眼蚤异常亚种和长突眼蚤 rDNA ITS2 序列进行了测定与分析,为蚤类分子系统发育的研究提供重要的基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料来源

实验所用标本均由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心于心教授和叶瑞玉教授馈赠,标本信息见表 1。

表 1 眼蚤属两蚤种标本信息

Tab. 1 Sample information of the two species

种名	编号	性别	采集地点	宿主
伏河眼蚤	FHA	♂	新疆阿尔泰	跳鼠
异常亚种	FHB	♀	新疆阿尔泰	跳鼠
<i>O. v. extrema</i>	FHC	♀	新疆阿尔泰	跳鼠
长突眼蚤	CTA	♂	新疆和田	三趾跳鼠
<i>O. kiritschenkoi</i>	CTB	♀	新疆和田	三趾跳鼠
	CTC	♀	新疆和田	三趾跳鼠

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和标本鉴定

提取 DNA 前,将乙醇保存的标本置于 TE 缓冲液中洗去乙醇。然后将标本切成三段,胸段用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA,剩余的几丁质部分再用 10% 的 KOH 溶液在室温下腐蚀 3~5 d 后制成玻片标本进行鉴定。

1.2.2 PCR 扩增及测序

扩增引物参考鲁亮、吴厚永(2002)^[3]所用引物。ITS2Sen:5'-ATCACTCGGCTCGTGGATCG-3',ITS2Rev:5'-ATGCTTAAATTTAGGGGTAGTC-3'。PCR 反应体系为 25 μ l、包括 10 \times Buffer 缓冲液 2.5 μ l、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μ l, dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L)2.0 μ l、上下游引物(10 mmol/L)各 2.0 μ l、模板 DNA (50 ng/ μ l) 2.0 μ l、Taq 酶(5 U/ μ l)0.2 μ l、双蒸水补足 25 μ l。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C,5 min \rightarrow 30 循环(94 $^{\circ}$ C,1 min \rightarrow 45 $^{\circ}$ C,30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C,1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C,5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段后送生物公司进行测序。

1.2.3 序列分析

将测序结果上传至 GenBank,应用 CLUSTAL X 软件进行序列比对。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

两蚤种 ITS2 序列扩增产物电泳图见图 1,扩增长度约 500 bp,包括 5.8S 和 28S 部分序列,以及 ITS2 全长。

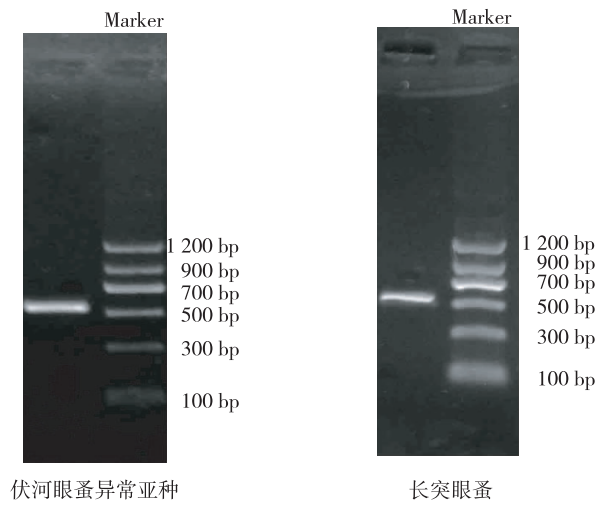


图 1 伏河眼蚤异常亚种和长突眼蚤 ITS2 电泳图
Fig. 1 Electropherograms of ITS2 of *O. v. extrema* and *O. kiritschenkoi*

2.2 测序结果

测得伏河眼蚤异常亚种和长突眼蚤 rDNA ITS2 各 3 个个体的序列(GenBank 登录号为 GQ161956-GQ161961)。每一序列包括 5.8S、28S 部分序列和 ITS2 全长,序列的长度、GC 含量见表 2。

2.3 序列分析

用 CLUSTAL X 软件对两蚤种的 rDNA ITS2 序列进行分析,两蚤种 ITS2 序列一致性为 92.29%。两者共有 30 处碱基不同,包括 16 处缺失/插入、4 处转换,10 处颠换,种内无差异,结果见表 3。

3 讨论

rDNA 是编码核糖体 RNA 的基因,是一类中度重复的 DNA 序列,以串联多拷贝形式存在于核 DNA 中。每个重复单位包括 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因编码区,内转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer)以及在 18S rDNA 上游和 28S rDNA 下游的外转录间隔区 ETS(external transcribed spacer),ITS 和 ETS 区的转录物均在 rRNA 成熟过

表 2 眼蚤属两蚤种 5. 8S、ITS2 和 28S 序列分析
Tab. 2 Analysis of 5. 8S, ITS2 and 28S rDNA sequences of the two species

种名	5. 8 S(bp)	ITS2 (bp)	28 S (bp)	C + G %
伏河眼蚤异常亚种 <i>O. v. extrema</i>	53 (1 ~ 53)	372 (54 ~ 425)	41 (426 ~ 466)	49. 7
长突眼蚤 <i>O. kiritschenkoi</i>	53 (1 ~ 53)	380 (54 ~ 433)	41 (434 ~ 474)	48. 4

表 3 眼蚤属两蚤种 rDNA ITS2 序列的变异
Tab. 3 Variations of rDNA ITS2 of the two species

种名	序列编号	碱基及位置																			
伏河眼蚤	CQ161956 T ₇	—	G ₄₃	T ₅₁	—	G ₈₄	G ₈₈	A ₉₁	A ₉₆	TA ₉₇₋₉₈	C ₁₀₂	T ₁₀₆	C ₁₀₇	C ₃₀₈	G ₃₀₉	G ₃₁₅	C ₃₂₁	—	—	T ₃₅₅	A ₃₅₉
异常亚种	CQ161957 T ₇	—	G ₄₃	T ₅₁	—	G ₈₄	G ₈₈	A ₉₁	A ₉₆	TA ₉₇₋₉₈	C ₁₀₂	T ₁₀₆	C ₁₀₇	C ₃₀₈	G ₃₀₉	G ₃₁₅	C ₃₂₁	—	—	T ₃₅₅	A ₃₅₉
<i>O. v. extrema</i>	CQ161958 T ₇	—	G ₄₃	T ₅₁	—	G ₈₄	G ₈₈	A ₉₁	A ₉₆	TA ₉₇₋₉₈	C ₁₀₂	T ₁₀₆	C ₁₀₇	C ₃₀₈	G ₃₀₉	G ₃₁₅	C ₃₂₁	—	—	T ₃₅₅	A ₃₅₉
长突眼蚤	CQ161959 A ₇	ACG ₃₆₋₃₈	A ₄₆	A ₅₄	TG ₅₅₋₅₆	—	A ₉₂	T ₉₅	C ₁₀₀	—	T ₁₀₄	C ₁₀₈	T ₁₀₉	A ₃₁₁	A ₃₁₂	T ₃₁₈	T ₃₂₄	A ₃₂₅	TAACCG ₃₄₈₋₃₅₃	A ₃₆₅	—
<i>O. kiritschenkoi</i>	CQ161960 A ₇	ACG ₃₆₋₃₈	A ₄₆	A ₅₄	TG ₅₅₋₅₆	—	A ₉₂	T ₉₅	C ₁₀₀	—	T ₁₀₄	C ₁₀₈	T ₁₀₉	A ₃₁₁	A ₃₁₂	T ₃₁₈	T ₃₂₄	A ₃₂₅	TAACCG ₃₄₈₋₃₅₃	A ₃₆₅	—
	CQ161961 A ₇	ACG ₃₆₋₃₈	A ₄₆	A ₅₄	TG ₅₅₋₅₆	—	A ₉₂	T ₉₅	C ₁₀₀	—	T ₁₀₄	C ₁₀₈	T ₁₀₉	A ₃₁₁	A ₃₁₂	T ₃₁₈	T ₃₂₄	A ₃₂₅	TAACCG ₃₄₈₋₃₅₃	A ₃₆₅	—

程中被降解^[9]。ITS 被 5. 8S rDNA 分成两段,即位于 18S 和 5. 8S rDNA 之间的 ITS1 以及 5. 8S 和 28S rDNA 之间的 ITS2。ITS 区一般在昆虫中全长 1. 0 ~ 1. 5 kb,它在昆虫的系统发育研究中得到了广泛的应用^[10]。

目前,在蚤类系统发育的研究中,rDNA ITS 的研究还比较少见。国内,仅见鲁亮、吴厚永(2002)分析了新蚤属 *Neopsylla* 9 个蚤种的 rDNA ITS2 的序列,并基于此序列建立了新蚤属系统发育树,其结果与形态学分类基本一致,并认为将红羊新蚤 *N. hongyangensis* 置于毛新蚤种团 *setosa group* (狭义)是不合适的,而且思博新蚤 *N. siboi* 的起源也待进一步的分析^[3];赵文静,漆一鸣^[4](2010)对方形黄鼠蚤七河亚种 *Citellophilus tesquorum dzetysuensis* 和阿尔泰亚种 *C. t. altaicus* 的 ITS 序列进行了测定和分析,两亚种在 ITS1 序列上存在差异而 ITS2 序列无差异。国外,Luchetti, A. ^[5](2005)对 *Tunga trimamillata* 和穿皮潜蚤 *T. penetrans* ITS2 序列进行分析,两者间存在 27 处碱基差异;之后 Luchetti, A. ^[6](2007)又分别对南美和非洲多个国家穿皮潜蚤 rDNA ITS2 序列进行了研究,在其所做的 45 个克隆中,测序结果显示 ITS2 没有明显差异,但作者根据仅有的 3 个一致性碱基差异,仍将两地理株区分开来;Gamerschlag, S. ^[7](2008)分别对禽角头蚤 *Echidnophage gallinacea*、人蚤 *Pulex irritans*、猫栉首蚤 *Ctenocephalides felis*、美洲兔蚤 *Spilopsyllus cucinuli* 及南美和非洲的穿皮潜蚤 rDNA ITS1 进行了比较分析,五种蚤的 ITS1 序列存在明显差异,南美穿皮潜蚤 ITS1 序列相对非洲穿皮潜蚤有连续的 197bp 碱基缺失。以上研究表明,rDNA ITS 序列可

作为蚤属、种、种群水平研究的分子标记。
本研究分析了伏河眼蚤异常亚种和长突眼蚤各 1 雄 2 雌共 6 个个体 rDNA ITS2 序列,结果表明,两蚤种 rDNA ITS2 序列一致性为 92. 29%,两者存在 30 处碱基不同,包括 16 处缺失/插入、4 处转换,10 处颠换,种内无差异。此次研究表明,rDNA ITS2 序列可作为伏河眼蚤异常亚种和长突眼蚤鉴别的分子标记,从而为蚤类分子系统发育的研究提供了重要的基础资料。
致谢:新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心于心教授和叶瑞玉教授馈赠标本,特此致谢!

4 参考文献

[1] 吴厚永. 中国动物志昆虫纲蚤目[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2007:1347.
[2] 刘殿锋,蒋国芳. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用[J]. 动物分类学报,2005 (3) : 484 - 492.
[3] 鲁亮,吴厚永. 新蚤属 9 种新蚤核糖体 DNA ITS2 序列变化[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002 (2) :106 - 110.
[4] 赵文静,漆一鸣. 方形黄鼠蚤 (*Citellophilus tesquorum*) 二亚种 rDNA ITS1、ITS2 序列的测定与分析[J]. 贵阳医学院学报,2010 (3) :240 - 246.
[5] Luchetti A, Mantovani B, Pampiglione S, et al. Molecular characterization of *Tunga trimamillata* and *T. penetrans* (Insecta, Siphonaptera, Tungidae): taxonomy and genetic variability[J]. Parasite, 2005 (2) :123 - 129.
[6] Andrea Luchetti, Massimo Trentini. Genetic variability of *Tunga penetrans* (Siphonaptera, Tungidae) sand fleas across South America and Africa[J]. Parasitol Res, 2007 (100) :593 - 598.

研究表明,对自身健康关注的医学生睡眠质量好于不关注者,而患有慢性疾病者睡眠质量较差。对自身健康的关注反映了医学生的健康观,关注自己健康的个体更趋向于选择有利于健康的行为生活方式,可能较能认识到睡眠对健康的重要性;患有慢性疾病者可能由于生理上的疼痛或其它不适而影响睡眠,亦可能由于情绪改变而影响睡眠。本研究表明,经常锻炼者睡眠质量好于基本不锻炼者,经常进行体育锻炼,参加运动能增加大脑的血流量,有利于大脑皮层功能的恢复;运动还可通过对人体神经系统的影响来调节和改善睡眠^[11]。

恋爱失败、父母不和、家庭经济状况不良、自己负担有债务、家庭成员重病、与老师关系紧张、与同学关系不和、与家庭成员相处不甚融洽及与同学竞争激烈等是医学生日常生活中常见的生活事件,它们均可作为一种应激源,与睡眠质量、疾病及身心健康有着非常密切的关系^[12]。大学阶段仍处于人格完善阶段,在面对应激事件时如得不到及时的心理疏导,易产生焦虑、紧张、易怒等不良情绪,且一旦被激发后又很难平复,从而导致情绪障碍而影响睡眠。

结合本研究结果,要切实改善医学生的睡眠质量,促进其身心健康的发展,建议在医学生中大力开展睡眠宣传活动,如“世界睡眠日”,帮助医学生树立正确的健康观,自觉采纳有利于提高睡眠质量的行为,如提高对自身健康的关注、经常参加体育锻炼等;还应加大医学教学改革力度,合理安排医学生的教学和实践,帮助顺利完成学业;坚持“以人为本、预防为主”的理念,着重加强学生心理素

质培养,有针对性开展心理咨询或辅导,适时疏导不良情绪,帮助积极应对应激事件。

4 参考文献

[1] 吴小燕,谢娟,张晓颖,等. 医学生睡眠质量影响因素分析[J]. 中国公共卫生,2009(9):1032-1034.

[2] 肖海兵,王芳,孙圣刚,等. 不同层次医学生睡眠状况及其与精神因素的相关分析[J]. 中国学校卫生,2008(2):146-148.

[3] 王海智,王波,陈练,等. 医学生睡眠质量及其相关因素研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2010(6):776-779.

[4] 汪向东,王希林,等. 心理卫生评定量表手册(增订版)[M]. 北京. 中国心理卫生杂志社,1999:375-378.

[5] 刘贤臣,唐茂芹,胡蕾. 匹兹堡睡眠质量指数的信度和效度研究[J]. 中华精神科杂志,1996(2):103-107.

[6] 王金权,姚应水,艾东. 医学生睡眠质量及其影响因素的调查分析[J]. 皖南医学院学报,2010(1):73-75.

[7] 伍兴,刘成,郝丽君,等. 医学生睡眠质量及其影响因素研究[J]. 现代预防医学,2008(1):98-100,102.

[8] 童萍,吴承红. 大学生睡眠质量与健康状况的相关研究[J]. 中国健康心理学杂志,2010(2):181-184.

[9] 潘敬菊,谭晓东,谢朝军,等. 大学生睡眠质量和相关影响因素调查[J]. 中国热带医学,2007(5):845-847.

[10] 李森晶,魏赞鹏,朴玉霞. 医学院校学生睡眠质量调查[J]. 实用预防医学,2009(5):1629-1630.

[11] 陈素珍. 运动对大学生睡眠质量影响的调查研究[J]. 科技信息,2007(29):212-213.

[12] 王小丹,高允锁,郭敏. 大学生睡眠质量及其影响因素的综述[J]. 中国热带医学,2006(10):1906-1907.

(2011-02-28 收稿,2011-03-01 修回)

(上接第 153 页)

[7] Sara Gamerschlag, Heinz Mehlhorn. Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera)[J]. Parasitol Res, 2008(102):193-199.

[8] Michael F Whiting, Alison S Whiting, Michael W H As-tritter, et al. A molecular phylogeny of fleas (Insecta:Siphonaptera):origins and host associations[J]. Cladistics,

2008(20):1-31.

[9] 刘伟,陈晓峰,王瑛. rDNA 在昆虫纲系统发育研究中的应用[J]. 昆虫知识,1998(2):123-126.

[10] 刘延滨,姬兰柱. 核 rDNA ITS 序列在昆虫学研究上的应用[J]. 应用生态学报,2007(5):1137-1142.

(2011-01-14 收稿,2011-02-18 修回)